



REC'D 14 JAN 2005
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le \_\_\_\_\_

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

► N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

**REMISE DES PIÈCES**

DATE

31 OCT 2003

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

Réserve à l'INPI

0312796

31 OCT. 2003

**Vos références pour ce dossier**

(facultatif) 240237 D20831 ANB

**Confirmation d'un dépôt par télécopie**

N° attribué par l'INPI à la télécopie

**2 NATURE DE LA DEMANDE**

Demande de brevet

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de certificat d'utilité

Demande divisionnaire

Demande de brevet initiale

ou demande de certificat d'utilité initiale

Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale

Date

Date

Date

**3 TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé de synthèse directe d'oligorhamnosides, composition comprenant des oligorhamnosides et utilisation en tant que médicament.

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ**

**OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE**

**LA DATE DE DÉPÔT D'UNE**

**DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date  N°

Pays ou organisation

Date  N°

Pays ou organisation

Date  N°

S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

Personne morale

Personne physique

PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE

SOCIETE ANONYME

319137576

45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT  
FRANCE

FRANCE

Française

N° de télécopie (facultatif)

S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

Remplir impérativement la 2<sup>e</sup> page

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa

N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/3

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 Q W / 030103

REMISSON DES PIÈCES		Réservé à l'INPI	
DATE	31 OCT 2003		
LEU	75 INPI PARIS		
N° D'ENREGISTREMENT	0312796		
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI			
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE	31 OCT. 2003		
PAR L'INPI			
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240237 D20831 ANB			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>			
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>			
Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>			
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N° <input type="text"/>	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		N° <input type="text"/>	Date <input type="text"/>
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé de synthèse directe d'oligorhamnosides, composition comprenant des oligorhamnosides et utilisation en tant que médicament.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b>			
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE			
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE			
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE			
Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°			
Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°			
Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°			
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »			
<b>5 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)			
Nom ou dénomination sociale		Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique <input type="checkbox"/>	
Prénoms		PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE	
Forme juridique		SOCIETE ANONYME	
N° SIREN		319137576 <input type="text"/>	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT FRANCE	
	Code postal et ville		
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »			

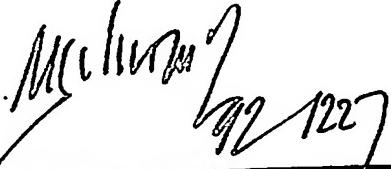
**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/3

**BR2**

REMISE DES PIÈCES	Réserve à l'INPI
DATE	31 OCT 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0312796
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 030103

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		240237 ANB
Nom _____		Cabinet REGIMBEAU
Prénom _____		
Cabinet ou Société _____		
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel _____		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif) _____		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif) _____		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif) _____		info@regimbeau.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		
<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé		
<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		
<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> Unique pour les personnes physiques		
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG _____		
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		 <b>SCARIMPF</b>
		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE</b> <b>OU DE L'INPI</b>



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE  
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**cerfa**  
N° 11354\*02

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

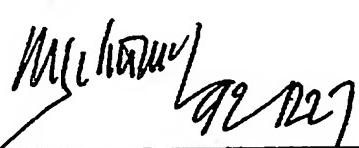
Page suite N° ... / ...  
3 3



REMETTEUR DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	31 OCT 2003	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0312796	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 W / 011001

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		240237 ANB
<b>4 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date [ ] N° Pays ou organisation Date [ ] N° Pays ou organisation Date [ ] N°
<b>5 DEMANDEUR (cochez l'une des cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
Prénoms		
Forme juridique		ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTÈRE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE
N° SIREN		[ ]
Code APE-NAF		304981310
Domicile ou siège	Rue	3, rue Michel Ange 75016 PARIS
	Code postal et ville	[ ]
	Pays	
Nationalité		FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		Française
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>5 DÉMANDEUR (cochez l'une des cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		[ ]
Code APE-NAF		[ ]
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	[ ]
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		 SCHERRIMPF
		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention concerne un procédé de synthèse directe d'oligorhamnosides. Le 5 procédé de synthèse consiste en une réaction « one-pot » dans l'acétonitrile, sans aucune réaction de protection ou de déprotection du rhamnose. Le mélange d'oligorhamnosides obtenu présente une activité anti-inflammatoire.

La réaction inflammatoire est une réponse du système immunitaire face à une 10 agression causée aux cellules ou aux tissus vascularisés d'un organisme par un pathogène tel que les virus, les bactéries ou bien face à une agression chimique ou physique. Souvent douloureuse, l'inflammation est généralement une réponse de guérison. Cependant dans certains cas, (arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies autoimmunes...) elle peut avoir des conséquences plus graves que le stimulus 15 d'origine.

Les réactions d'hypersensibilité de contact correspondent à des réactions d'immunité spécifique dirigées contre des antigènes localisés sur des cellules ou dans les tissus, à l'origine de lésions cellulaires ou de réactions inflammatoires. Ces réactions 20 d'hypersensibilité peuvent se développer dans le cadre des mécanismes de défense vis-à-vis d'un microorganisme pathogène ou dans le cas de réactions allergiques. Elles font intervenir différents types de cellules et en particulier les cellules de la peau, certains leucocytes, sans oublier les cellules endothéliales dont le rôle est prépondérant dans les réactions inflammatoires.

Les interactions intercellulaires qui interviennent alors impliquent généralement des 25 phénomènes de reconnaissances spécifiques entre ligands et récepteurs. Au cours de ces vingt dernières années, de nombreux récepteurs de surface cellulaires ont été identifiés, tels que des protéines capables d'assurer une reconnaissance spécifique avec certains sucres comme le fucose et le rhamnose.

Les lectines sont des protéines implantées dans les membranes des cellules eucaryotes, 30 et jouent un rôle très important dans les phénomènes d'adhésion et de reconnaissance entre cellules notamment lors des processus inflammatoires. Les lectines membranaires sont impliquées en particulier dans l'endocytose, le trafic intracellulaire

des glycoconjugués et la perméabilité endothéliale. De plus, ces protéines, souvent transmembranaires, contribuent à la reconnaissance spécifique de l'antigène (domaine extracellulaire) et à l'activation des cellules (domaine intracellulaire). Les lectines peuvent reconnaître spécifiquement certains sucres, notamment le rhamnose.

- 5 L'étude, ainsi que l'utilisation thérapeutique d'oligorhamnosides, impliquent de plus en plus de disposer de ces produits en grande quantité. Malheureusement ceux-ci sont difficiles à isoler sous une forme homogène à partir de cellules vivantes, de par le fait qu'ils existent sous la forme de mélanges microhétérogènes. La purification de tels composés, lorsque cela est possible, est difficile et aboutit généralement à de très
- 10 faibles rendements. Ces contraintes montrent l'intérêt de disposer d'une méthode de synthèse simple et efficace d'oligorhamnosides.

De nombreux chercheurs se sont essayés au cours du siècle dernier à proposer des méthodes originales dans la synthèse d'oligosaccharides. Les premières ont été initiées avec Fischer, Koenigs et Knorr, Lemieux (Lemieux, R.U., Morgan, A.R., *The preparation and configurations of tri-O-acetyl-alpha-D-glucopyranose 1,2-(orthoesters)*. Canadian journal of chemistry, 1965. 43: p. 2199-2204) qui introduirent les notions d'activation et de protection des unités saccharidiques. Ensuite, Paulsen (Paulsen, H., Kutschker, W., Lockhoff, O., *Building units for Oligosaccharides, XXXIII: synthesis of beta-glycosidically linked disaccharides of L-rhamnose*. Chemical Berstein, 1981. 114: p. 3233-3241), et plus récemment Schmidt et Seeberger (Seeberger, P.H.H.W.C., *Solid-phase oligosaccharides synthesis and combinatorial carbohydrate libraries*. Chemical reviews, 2000. 100(n°12): p. 4349-4393; Seeberger, P.H., Plante, O.J., *Synthesis of oligosaccharides, reagents and methods related thereto*. 2001, MIT (Cambridge MA): United States. p. 50) proposèrent des méthodes plus complexes sur support solide afin d'améliorer les rendements et la spécificité des réactions. La synthèse d'oligosaccharides avait comme objectif d'exploiter leur biocompatibilité afin de trouver de nouvelles substances thérapeutiques. Cependant, ces méthodes reposent sur des stratégies qui nécessitent toutes des étapes de protection et de déprotection des sucres. Ces méthodes de synthèse restent donc lourdes et s'accompagnent malheureusement de rendements très faibles diminuant les possibilités

d'industrialisation. Il est donc primordial de trouver un procédé original adapté qui permettrait la synthèse de ces composés avec un minimum d'étapes réactionnelles.

- 5 D'une manière surprenante, les inventeurs ont découvert qu'il était possible de synthétiser directement dans l'acétonitrile des oligorhamnosides (synthèse « one-pot ») sans aucune réaction de protection ni de déprotection du rhamnose.
- Cette synthèse en une seule étape réactionnelle utilise les propriétés particulières de solubilité du rhamnose dans l'acétonitrile : le rhamnose est très peu soluble dans  
10 l'acétonitrile froid et peu soluble à chaud.

Au sens de la présente invention, on entend par « oligorhamnoside » tout oligomère constitué de motifs rhamnooses, de configuration lévogyre ou dextrogyre, avantageusement lévogyre, liés entre eux par des liaisons glycosidiques de  
15 configuration  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ledit oligomère peut être linéaire ou sous forme ramifiée.

La présente invention concerne un procédé de préparation d'oligorhamnosides comprenant les étapes successives suivantes :

- 20 a) auto-condensation du rhamnose en une seule étape réactionnelle dans l'acétonitrile en présence d'un catalyseur acide et précipitation des oligorhamnosides ainsi formés ; puis
- b) récupération du précipité obtenu suite à l'étape a), comprenant les oligorhamnosides, par filtration.

L'originalité du procédé tient au fait que la réaction d'auto-condensation du rhamnose dans l'acétonitrile se fasse directement sans étape préliminaire de protection des fonctions hydroxyles du rhamnose et, de la même manière, sans étape successive de déprotection des fonctions hydroxyles du rhamnose.

25 Lors de ladite étape a), on travaille avantageusement en milieu homogène pour limiter l'excès de rhamnose dans le brut final, tout en travaillant à saturation pour assurer la précipitation rapide des oligorhamnosides. Ainsi, la solution d'acétonitrile est  
30 avantageusement saturée en rhamnose.

Le mélange rhamnose, acétonitrile et catalyseur acide est avantageusement mis à réagir sous chauffage et éventuellement sous agitation, à une température comprise entre 20 et 120°C, encore plus avantageusement entre 35 et 75°C. La température d'autocondensation ne doit pas dépasser 120°C afin d'éviter une dégradation des 5 sucres. D'une manière avantageuse, la température de chauffage est d'environ 65°C à pression atmosphérique. Le mélange rhamnose, acétonitrile et catalyseur acide est avantageusement mélangé de 5 minutes à 24 heures, encore plus avantageusement 3 heures.

Dans la chimie des sucres, il est très classique d'utiliser un catalyseur acide pour 10 favoriser la formation de liaisons glycosidiques. Dans le cadre de la présente invention, le catalyseur acide est avantageusement choisi dans le groupe constitué par l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide ortho-, méta-, et para-toluène sulfonique, l'acide benzène-sulfonique, les acides benzène-sulfoniques substitués, l'acide méthane-sulfonique, les acides de Lewis, notamment le chlorure de zinc ou le chlorure ferrique, des argiles acides, notamment la montmorillonite K-10, des résines acides synthétiques, les zéolithes ou leurs combinaisons.

Les acides benzène-sulfoniques substitués sont avantageusement les acides ortho-, méta-, para-bromobenzènesulfonique.

Les acides de Lewis sont par exemple le chlorure de zinc, le chlorure ferrique ou tout 20 autre halogénure de métal, métalloïde ou lanthanide.

Comme exemple de résines acides synthétiques, on peut notamment citer les résines acides synthétiques de type « Amberlyst® », « Amberlite® » ou « Dowex® ».

La quantité de catalyseur doit être contrôlée car la réaction est très rapide. Afin de contrôler davantage la réaction, il est nécessaire de ralentir cette réaction. La quantité 25 de catalyseur acide ajoutée est avantageusement fixe. La quantité de catalyseur ajoutée correspond avantageusement à environ 0,1 mole de catalyseur pour 1 mole de rhamnose.

L'eau formée pendant la réaction d'auto-condensation de l'étape a) est 30 avantageusement éliminée, physiquement ou chimiquement. Comme exemple de technique d'élimination physique de l'eau formée pendant la synthèse, on peut notamment citer la distillation ou l'utilisation d'un adsorbant. Comme exemple de

technique d'élimination chimique de l'eau formée pendant la synthèse, on peut notamment citer l'utilisation d'un agent de dessiccation.

Selon une variante avantageuse de l'invention, l'eau formée pendant la réaction d'auto-condensation de l'étape a) est éliminée au moyen d'un agent de dessiccation 5 choisi dans le groupe constitué par les carbonates, les sulfates, le chlorure de calcium, le pentaoxyde de phosphore, des tamis moléculaires ou des combinaisons de ces divers agents de dessiccation. L'agent de dessiccation peut être introduit directement dans le milieu réactionnel ou être présent au niveau des vapeurs de solvant à l'intérieur d'une cartouche d'extraction solide/liquide de type « soxhlet ».

10

Selon une variante de l'invention, la réaction d'auto-condensation de l'étape a) est réalisée à pression atmosphérique et sous atmosphère d'un gaz inerte, tel que l'argon ou l'azote.

Selon une autre variante de l'invention, la réaction d'auto-condensation de l'étape a) 15 est réalisée à pression réduite (de préférence environ 260 mbar), avantageusement en autoclave.

Les réactifs peuvent être introduits de manière fractionnée ou continue de façon à ce que la réaction puisse toujours être réalisée dans les rapports molaires les plus favorables.

20

Préalablement à l'étape b), le mélange réactionnel est avantageusement refroidi jusqu'à une température comprise entre la température de réaction de condensation et 0°C, encore plus avantageusement jusqu'à la température ambiante, c'est-à-dire environ jusqu'à 20°C.

25 Cette étape additionnelle de refroidissement favorise la précipitation des oligorhamnosides formés lors de l'étape a).

Le précipité récupéré lors de l'étape b) est appelé précipité P1. Il est avantageusement récupéré par filtration telle qu'une filtration sur Büchner.

30 Ledit précipité P1 est avantageusement lavé à l'acétonitrile. Le filtrat obtenu suite à l'étape b) est évaporé sous pression réduite afin de récupérer un second précipité (P2)

contenant le rhamnose n'ayant pas réagi mais aussi des dérivés rhamnosylés du précipité P1 passés en solution.

La précipitation d'oligorhamnosides au cours de la réaction libère des molécules de solvant (acétonitrile). Ainsi, il se produit de manière réversible une solubilisation des 5 plus faibles masses, et c'est pourquoi le précipité P2 obtenu par évaporation de la phase acétonitrile contient une partie riche de rhamnose mais également une fraction des oligorhamnosides synthétisés.

Les oligorhamnosides obtenus présentent un degré de polymérisation maximum égal à 12, avantageusement compris entre 2 et 9.

10 On pense que la modification des conditions opératoires ne contribue pas au changement de la distribution des masses mais uniquement à une modification de la cinétique de formation des oligorhamnosides. En effet, si on considère qu'à partir d'une certaine taille, un oligomère n'est plus soluble dans l'acétonitrile et précipite, alors ce phénomène peut être accompagné de deux autres phénomènes sous-jacents et opposés. Le premier est la libération de molécules de solvant qui seront alors disponibles pour solubiliser davantage les oligomères de plus petites tailles, et le second est un phénomène de coprécipitation. Un oligomère de masse suffisamment importante peut provoquer la précipitation de ses homologues plus petits lorsqu'il devient insoluble dans le milieu réactionnel.

20 Ces trois phénomènes, de précipitation, coprécipitation et resolubilisation, sont probablement à l'origine d'une uniformité qualitative, dans la distribution de masse.

Les motifs rhamnose ont jusqu'à trois de leurs fonctions hydroxyles qui sont impliquées dans la formation de liaisons glycosidiques. En théorie, le motif rhamnose ayant quatre fonctions hydroxyles, il pourrait former quatre liaisons glycosidiques.

25 Cependant, lors de la mise en œuvre du procédé selon l'invention, on a constaté qu'au maximum trois des fonctions hydroxyles des motifs rhamnose sont impliquées dans la formation de liaisons glycosidiques. On pense que ceci est dû à des problèmes d'encombrements stériques.

Le rendement massique en oligorhamnosides du procédé selon l'invention est compris

30 entre 30 et 60%, par rapport à la quantité massique de rhamnose introduite.

La présente invention concerne également une composition comprenant un mélange d'oligorhamnosides susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention, lesdits oligorhamnosides contenant de 2 à 12 motifs rhamnose, avantageusement de 2 à 9 motifs rhamnose.

- 5 La distribution des oligorhamnosides en fonction de leur degré de polymérisation suit approximativement une loi de distribution du type loi de Poisson.

Les motifs rhamnoses ont jusqu'à trois de leurs fonctions hydroxyles qui sont impliquées dans la formation de liaisons glycosidiques. Les liaisons glycosidiques peuvent être des liaisons en  $\alpha$  ou des liaisons en  $\beta$ .

10

La présente invention concerne aussi un médicament comprenant une composition selon l'invention, c'est-à-dire un mélange d'oligorhamnosides tel que défini précédemment.

- 15 Le médicament selon l'invention est avantageusement destiné à réguler les mécanismes inflammatoires.

En particulier, le médicament est destiné à la prévention ou au traitement des réactions ou pathologies allergiques, inflammatoires, immunitaires de la peau et/ou des muqueuses. Le médicament selon l'invention est également destiné à inhiber la  
20 réponse immunitaire liée au stress inflammatoire.

- Le médicament selon l'invention est notamment destiné à inhiber l'activation des leucocytes, tels que les polynucléaires humains et notamment les neutrophiles et les mastocytes humains empêchant la libération des médiateurs préformés de la réaction immunitaire. Il permet également l'inhibition de l'adhésion des lymphocytes circulants  
25 et des cellules endothéliales empêchant ainsi la transmigration de ces leucocytes sur le lieu de l'inflammation. Il permet aussi l'inhibition de la sécrétion des cytokines kératinocytaires, activatrices des lymphocytes T et des cellules de Langerhans, telles que IL-1, TNF- $\alpha$ , ou des molécules d'adhésion, telles que ICAM-1, VCAM, qui contribuent au recrutement et au passage trans-endothelial des leucocytes. Le  
30 médicament selon l'invention est également inhibiteur du phénomène d'hyperplasie kératinocytaire.

Le médicament selon l'invention est aussi inhibiteur du processus d'apprétement de l'antigène par les cellules dendritiques de la peau, de la maturation des cellules présentatrices d'antigène, à savoir les cellules dendritiques dermiques et les cellules de Langerhans, du phénomène de reconnaissance entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène.

5 Ainsi, le médicament selon l'invention est destiné à la prévention ou au traitement des maladies choisies dans le groupe constitué de l'eczéma atopique et/ou de contact, des dermatoses inflammatoires, des dermatites irritatives, de l'acné, des maladies auto-immunes telles que le psoriasis, de la photo-immuno-suppression, du vitiligo, du  
10 pityriasis, des sclérodermies, de l'arthrite rhumatoïde, de la maladie de Crohn ou du rejet de greffe.

Le médicament selon l'invention est également destiné à la prévention et au traitement des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences. Le  
15 médicament est notamment destiné à la prévention ou au traitement des maladies choisies dans le groupe constitué par les sensibilisations anaphylactiques, les anomalies pigmentaires de la peau, l'hypervascularisation dermique, les fissurations inflammatoires.

Selon une variante de l'invention, le médicament est destiné à diminuer le caractère allergisant et/ou irritant d'une composition ou d'un parfum.

20 Le médicament selon l'invention comprend avantageusement 0,001 à 50% en poids d'oligorhamnosides.

Le médicament selon la présente invention peut être formulé pour être administré par toute voie. Il est avantageusement formulé pour être administré par voie topique, orale, sous-cutanée, injectable, rectale et génitale.

25 Lorsque le médicament est formulé pour être administré par voie orale, ledit médicament peut se présenter sous la forme de solution aqueuse, émulsion, comprimés, gélules, capsules, poudres, granules, solutions ou encore de suspensions orales.

30 Lorsque le médicament est formulé pour être administré par voie sous-cutanée, ledit médicament ou ladite composition peut se présenter sous la forme d'ampoules injectables stériles.

Lorsque le médicament est formulé pour être administré par voie rectale, ledit médicament peut se présenter sous la forme de suppositoires.

Lorsque le médicament est formulé pour être administré par voie génitale, ledit médicament peut se présenter sous la forme d'ovules.

5 Le médicament selon l'invention est de préférence à application topique. Le médicament peut alors être formulé de manière à se présenter par exemple sous forme de solution aqueuse, de crème blanche ou colorée, de pommade, de lait, de lotion, de gel, d'onguent, de sérum, de pâte, de mousse, d'aérosol ou de stick.

La quantité du médicament selon l'invention à administrer dépend de la gravité et de  
10 l'ancienneté de l'affection traitée. Naturellement, le médecin adaptera aussi la posologie en fonction du malade.

La présente invention concerne également une méthode de traitement cosmétique des  
15 peaux et/ou des muqueuses sensibles, irritées, intolérantes, à tendance allergique, âgées, soumises à un signal danger, présentant un trouble de la barrière cutanée, présentant des rougeurs cutanées ou présentant un déséquilibre immunologique non pathologique lié au vieillissement intrinsèque, extrinsèque ou hormonal, caractérisée en ce qu'elle consiste à appliquer sur la peau et/ou les muqueuses une composition  
20 comprenant un mélange d'oligorhamnosides tel que défini précédemment.

La présente invention concerne aussi une méthode de traitement cosmétique pour retarder le vieillissement naturel de la peau et/ou pour prévenir le vieillissement accéléré de la peau soumise aux agressions extérieures, notamment pour prévenir le vieillissement photo-induit de la peau, caractérisée en ce qu'elle consiste à appliquer  
25 sur la peau une composition comprenant un mélange d'oligorhamnosides tel que défini précédemment.

Dans le cadre d'une utilisation cosmétique, la composition selon l'invention comprend avantageusement 0,001 à 50% en poids d'oligorhamnosides, par rapport au poids total de la composition.

30 Lorsque la composition cosmétique est formulée pour être administré par voie topique, ladite composition se présente par exemple sous forme de solution aqueuse, de crème

blanche ou colorée, de pommade, de lait, de lotion, de gel, d'onguent, de sérum, de pâte, de mousse, d'aérosol, de shampoing ou de stick.

- 5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après. Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes. Ces figures et exemples sont destinés à illustrer la présente invention et ne peuvent en aucun cas être interprétés comme pouvant en limiter la portée.

10

**Figure 1 :** Viabilité des cellules endothéliales issues des ganglions lymphatiques périphériques en présence de rhamnose.

**Figure 2 :** Viabilité des cellules endothéliales issues des ganglions lymphatiques périphériques en présence des oligorhamnosides.

**Exemple 1 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

Dans un ballon à 2 voies de 100 mL, surmonté d'un réfrigérant droit lui-même équipé d'une garde desséchante ( $\text{CaCl}_2$ ), on introduit sous balayage d'argon, 25 mL 5 d'acétonitrile (séché sur tamis moléculaire 3 Å). Le rhamnose (360 mg) est introduit dans l'acétonitrile à chaud (65 °C), en quatre fractions équivalentes, en attendant la complète dissolution avant d'ajouter la fraction suivante.

Le catalyseur acide *p*-toluène sulfonique (APTS), 0,3 mL d'une solution à 0,6 M (rapport massique de 0,1 g/g de rhamnose) est ajouté dans le mélange maintenu sous 10 argon. La solution est agitée (agitateur magnétique) à 65°C pendant 40 minutes.

Après réaction, l'agitation est coupée et le mélange refroidi à température ambiante pendant 30 minutes.

Le précipité (P1) formé est récupéré par filtration sous vide sur un verre fritté de porosité 4, puis est lavé à l'acétonitrile et à l'éther anhydre, puis repris dans un 15 minimum d'eau et lyophilisé. On obtient ainsi 126 mg d'une poudre blanche correspondant aux oligorhamnosides, soit un rendement de 35 %.

Le filtrat récupéré est évaporé à l'évaporateur rotatif sous pression réduite (15 mmHg), on obtient ainsi 234 mg d'un solide (P2) correspondant à un mélange rhamnose+oligorhamnosides de faibles masses moléculaires. La distribution de taille 20 ainsi que les masses des oligosaccharides synthétisés sont respectivement mesurées par HPLC et par spectrométrie de masse.

Les oligorhamnosides (P1) et (P2) sont analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur une colonne RSO-oligosaccharides, REZEX de marque Phenomex (200x10,0 mm) munie d'une colonne de garde (60x10,0 mm). Eluant 100 % 25  $\text{H}_2\text{O}$  à un débit de 0,3 mL/min et à une température de colonne de 80°C. Les échantillons injectés à 10  $\mu\text{L}$  d'une concentration de 50 mg/mL dans l'eau, sont détectés par un réfractomètre différentiel. Dans ces conditions, l'analyse dure 50 minutes et permet de séparer le rhamnose (47 minutes de temps de rétention) des dérivés rhamnosylés (temps de rétention de 15 à 44 minutes).

30 Les masses des oligorhamnosides (P1) et (P2) sont déterminées par spectrométrie de masse, électrospray pour les degrés de polymérisation de 1 à 5 et LSI-MS pour les degrés de polymérisation de 5 à 12. Ces analyses de masses font apparaître un degré

maximum de polymérisation égale à 12. Tous les types de liaisons glycosidiques sont trouvés, excepté le motif rhamnose où toutes les fonctions hydroxyles ont réagi.

**Exemple 2 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

5

On procède selon le protocole de l'exemple 1, mais dans ce cas la solution est agitée à 40 °C pour une durée de 40 minutes comme selon l'exemple 1.

Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits à l'exemple 1, on obtient 72 mg de précipité (P1) soit un rendement de 20 %.

10 La masse de solide (P2) récupérée étant dans cet exemple de 288 mg.

Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent aux mêmes résultats que ceux obtenus selon le protocole de l'exemple 1.

**Exemple 3 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

15

On procède selon les protocoles des exemples 1 et 2, mais dans ce cas la solution est agitée à 65 °C, mais pour une durée de 6 heures. Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits à l'exemple 1 et 2, on obtient 144 mg d'un précipité brun-jaune (P1) soit un rendement de 40 %.

20 La masse de solide (P2) récupérée étant dans cet exemple de 216 mg.

Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent mêmes résultats que ceux obtenus selon le protocole de l'exemple 1 et 2.

**Exemple 4 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

25

On procède selon les protocoles des exemples 1, 2, 3, mais dans ce cas la solution est agitée à 40 °C pour une durée de 6 heures. Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans les exemples 1 à 3, on obtient 126 mg d'un précipité (P1) soit un rendement de 35 %.

30 La masse de solide (P2) récupérée étant dans cet exemple de 234 mg.

Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent aux mêmes résultats que ceux obtenus selon les protocoles 1 à 3.

**Exemple 5 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

On procède selon le protocole de l'exemple 1, mais dans ce cas la quantité totale de rhamnose introduite dans l'acétonitrile à 65 °C est de 200 mg.

- 5 Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans les exemples 1 à 4, on obtient 30 mg de précipité (P1) soit un rendement de 15%.  
La masse de solide (P2) récupéré étant dans cet exemple de 170 mg.  
Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent aux mêmes résultats que ceux obtenus selon les protocoles 1 à 4.

10

**Exemple 6 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

On procède selon le protocole de l'exemple 1, mais dans ce cas la quantité de catalyseur APTS est plus importante, soit un rapport massique de 0,2 g/g de rhamnose.

- 15 Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans les exemples 1 à 5, on obtient 126 mg de précipité (P1) soit un rendement de 35 %.  
La masse de solide (P2) récupéré étant dans cet exemple de 234 mg.  
Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent aux mêmes résultats que ceux obtenus selon les protocoles 1 à 5.

20

**Exemple 7 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

On procède selon le protocole de l'exemple 1, mais sur un volume d'acétonitrile et une masse de rhamnose plus importante et une durée plus longue.

- 25 Dans un ballon à deux voies de 100 mL, surmonté d'un réfrigérant droit, lui-même équipé d'une garde desséchante ( $\text{CaCl}_2$ ), on introduit sous balayage d'argon, 80 mL d'acétonitrile sec. Le rhamnose (550 mg) est introduit dans l'acétonitrile chaud (65 °C) par petites fractions. Dans ce cas la solution est agitée à 65°C pour une durée de 4 heures.  
30 Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans les exemples 1 à 6, on obtient 137,5 mg de précipité (P1) soit un rendement de 25 %.  
La masse de solide (P2) récupéré étant dans cet exemple de 412,5 mg.

Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent aux mêmes résultats que ceux obtenus selon les protocoles 1 à 6.

**Exemple 8 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

5

On procède selon le protocole de l'exemple 1, mais en remplaçant l'acide *p*-toluène sulfonique (APTS) par une résine acide comme l'Amberlyst®15 dry.

Ce catalyseur (500 mg) est ajouté dans le mélange maintenu sous argon.

Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans les 10 exemples 1 à 7, on obtient 90 mg de précipité (P1) soit un rendement de 25%.

La masse de solide (P2) récupéré étant dans cet exemple de 270 mg.

Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent aux mêmes résultats que ceux obtenus selon les protocoles 1 à 7.

15 **Exemple 9 : Synthèse directe des oligorhamnosides**

Un ballon à deux voies de 100 mL est surmonté d'un extracteur solide/liquide de type « soxhlet» muni d'une cartouche d'extraction, lui-même surmonté d'un réfrigérant droit, équipée d'une prise de vide. La cartouche d'extraction est remplie de chlorure de calcium sec dans un rapport massique  $\text{CaCl}_2/\text{rhamnose}=20$  et surmontée d'un coton de verre.

Dans le ballon on introduit sous balayage d'argon, 80 mL d'acétonitrile (séché sur tamis moléculaire 3 Å).

Le rhamnose (550 mg) est introduit dans l'acétonitrile à chaud ( $65^\circ\text{C}$ ), en quatre 25 fractions équivalentes en attendant la complète dissolution avant d'ajouter la fraction suivante.

Le catalyseur acide *p*-toluène sulfonique (APTS), 1 mL d'une solution dans l'acétonitrile à 0,6 M (rapport massique 0,2 g/g de rhamnose) est ajouté dans le mélange maintenu sous argon.

30 Le montage est ensuite connecté à une source de vide (trompe à eau) munie d'un régulateur de pression afin d'atteindre 260 mbar. Une fois la pression atteinte, la solution est agitée (agitateur magnétique) à  $65^\circ\text{C}$ , température correspondant au reflux

de l' acétonitrile à la pression choisie. Le vide et la température sont maintenus pendant 4 heures, ce qui correspond à plusieurs cycles de remplissage et de siphonnage de l'extracteur.

Après réaction, le vide et l'agitation sont coupés, et le mélange refroidi à température 5 ambiante pendant 30 minutes.

Après réaction et traitements suivant les mêmes protocoles que ceux décrits aux exemples 1 à 8, on obtient 275 mg de précipité (P1) soit un rendement de 50%.

La masse de solide (P2) récupérée étant dans cet exemple de 275 mg.

Les analyses HPLC et spectrométrie de masse conduisent aux mêmes résultats que 10 ceux obtenus selon les protocoles 1 à 8.

#### Exemple 10: analyse pharmacologique des oligorhamnosides

Les différentes cellules de l'immunité intervenant dans ces processus de 15 l'inflammation ont été étudiées. Ce sont les cellules dendritiques de la peau, les cellules endothéliales, certains leucocytes et les kératinocytes.

##### 1) Principes des techniques de mesure de la viabilité cellulaire

❖ *technique de réduction du MTT, [3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (commercialisé par Sigma)*

20 Cette technique correspond à un test colorimétrique permettant la quantification des cellules vivantes, métaboliquement actives de manière non radioactive. Le MTT est une molécule cationique qui se fixe aux membranes des mitochondries de façon potentiel-dépendant. Au niveau des mitochondries le MTT sera réduit en bleu de formazan par la déshydrogénase mitochondriale. Les cellules vivantes se colorent donc 25 en bleu, à l'inverse des cellules mortes qui restent transparentes. La mesure de la viabilité est ensuite réalisée par mesure de la densité optique à l'aide d'un lecteur automatique.

Toutefois cette méthode d'analyse semble être mieux adaptée aux cellules adhérentes (type kératinocytes) que pour les cellules non adhérentes (monocytes et cellules 30 dendritiques). Une autre étude a donc été envisagée pour conclure sur la cytotoxicité des oligorhamnosides vis-à-vis des cellules différencierées analysées : la cytométrie de flux en présence d'iodure de propidium.

❖ *technique de réduction du sel de tétrazolium XTT.*

Il s'agit d'une technique permettant une quantification de la prolifération cellulaire et du nombre de cellules vivantes, (métaboliquement actives) sans incorporation d'isotopes radioactifs. Le XTT, de couleur jaune, est une molécule cationique qui se 5 fixe aux membranes des mitochondries de façon potentiel-dépendant, comme le fait le MTT.

Au niveau des mitochondries, le XTT sera réduit en formazan (orange) par la tétrazolium réductase mitochondriale. Cette méthode, plus onéreuse que la méthode du MTT, ne nécessite pas dans son protocole la lyse des cellules par le SDS pour libérer le 10 colorant. En effet le produit de réduction est soluble au sein de la cellule. La méthode est ainsi plus rapide. Les cellules vivantes, en absence et en présence d'un traitement avec un produit se colorent, à l'inverse des cellules mortes qui restent incolores. Le taux de formazan produit est détecté au spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 450 nm et est directement proportionnel au nombre de cellules métaboliquement 15 actives.

2) test de toxicité

- ❖ Des kératinocytes sont isolés et mis en culture à partir de biopsie de peau humaine. Les mesures de densité optique (absorbance) des 4 trous traités avec la même 20 concentration de produits sont moyennées. Cette moyenne est comparée à la moyenne des mesures obtenues pour les 4 trous témoin (test t de Student –comparaison des moyennes– différence significative à 95 % si  $p < 0,05$  et à 99 % si  $p < 0,01$ ). Les viabilités des cellules traitées sont exprimées en pourcentage par rapport au témoin (cellules non traitées) de 100 % ( $DO \text{ traité} / DO \text{ témoin} \times 100$ ). 25 Le rhamnose ne présente pas de cytotoxicité (cf. tableau 1), même pour les concentrations les plus élevées.

	Témoin	Rhamnose 1 mg/mL	Rhamnose 0,1 mg/mL	Rhamnose 0,01 mg/mL	Rhamnose 0,001 mg/mL
% viabilité	100	104	98	100	95
p (Student)		0,504	0,679	0,991	0,407

Tableau 1 : Viabilité des kératinocytes en présence de différentes concentrations en rhamnose.

Les oligorhamnosides présentent une toxicité aux fortes concentrations, supérieures à 5 mg/mL (cf. tableau 2).

	Témoin	Oligo rhamnosides 5mg/mL	Oligo rhamnosides 2mg/mL	Oligo rhamnosides 1mg/mL	Oligo rhamnosides 0,1mg/mL	Oligo rhamnosides 0,01mg/mL
% Viabilité	100	75	92	92	102	117
p (Student)		<0,01	0,072	0,104	0,554	<0,01

Tableau 2 : Viabilité des kératinocytes en présence de différentes concentrations en oligorhamnosides.

5

Des cellules endothéliales ont été mises en culture, immortalisées et stabilisées dans leur phénotype. Les lignées cellulaires étudiées sont les cellules endothéliales d'appendice, les cellules endothéliales microvasculaire de cerveau, les cellules endothéliales de ganglions lymphatiques mésenthérique, les cellules endothéliales de ganglions lymphatiques périphériques, les cellules endothéliales microvasculaires de la peau.

Le test de cytotoxicité est réalisé au moyen d'un test biochimique sur la transformation d'un sel de tétrazolium, le MTT. Les résultats obtenus sont très positifs, aucune toxicité n'est mise en évidence, que ce soit sur le rhamnose ou les oligorhamnosides testés (cf. figures 1 et 2). La viabilité est en effet toujours supérieure à 85 %, et ceci pour toutes les lignées de cellules étudiées.

**Figure 1 :** Viabilité des cellules endothéliales issues des ganglions lymphatiques périphériques en présence de rhamnose.

**Figure 2 :** Viabilité des cellules endothéliales issues des ganglions lymphatiques périphériques en présence des oligorhamnosides.

On note en particulier l'apparition d'un pic de stimulation correspondant à 4 heures d'incubation, temps nécessaire pour l'initiation de la synthèse protéique. La présence de ce pic est intéressante car il traduit que les cellules tolèrent les oligorhamnosides (absence de toxicité), et les assimilent. Ces produits semblent enrichir le milieu de culture.

Ces résultats sont similaires pour les autres lignées de cellules endothéliales.

3) Influence des oligorhamnosides sur des cellules humaines cultivées en milieu pro-inflammatoire

- *Sur les cellules dendritiques*

On analyse trois groupes de cellules, 1) celles qui n'ont jamais vu ni les oligorhamnosides, ni les signaux d'activation sélectionnés, elles serviront de témoin négatif, 2) celles qui ont été incubées pendant 24 heures avec les signaux d'activation, elles serviront de témoin positif, et enfin 3) celles qui ont été en contact pendant 24 heures avec les oligorhamnosides.

Le milieu de culture utilisé est un milieu classique de type RPMI 1640 (Bioproducts), additionné de SVF 10 % décomplémenté de glutamine (2 mM) et d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Bioproducts). Le liquide de rinçage utilisé est un tampon PBI (Bioproducts). L'activateur cellulaire utilisé est l'INF $\gamma$  (SIGMA).

Les résultats sont donnés dans le tableau 3 suivant :

	Témoin DMSO		Témoin LPS		Témoin nul			
	Viabilité (Iodure de propidium, PI)	CD86 B7.2 (Maturation)	1,27%	0,17%	85,63%	49,96%	92,6%	7,4%
	10mg/mL	5mg/mL	1mg/mL	0,5mg/mL	0,1mg/mL	0,05mg/mL		
	90%	91%	91%	92%	93%	93%		
	CD86 B7.2 (Maturation)	10%	6%	4%	4%	5%	3%	

Tableau 3

La viabilité est déterminée à partir de la mortalité traduite directement par la proportion de signal PI. Les résultats présentés dans le tableau 3 traduisent la viabilité cellulaire (100-mortalité), proportion de cellules vivantes dans chaque puit étudié.

L'effet allergisant est traduit par la maturation des cellules dendritiques et par l'expression du récepteur CD86 B7.2. Plus ce récepteur est exprimé, plus la proportion de cellules matures est importante, et plus le dérivé rhamnosylé étudié a des effets allergisants.

Les oligorhamnosides ne provoquent ni mort cellulaire, ni activation ou maturation accélérée des cellules dendritiques. En effet, les cellules dendritiques étudiées continuent à exprimer les récepteurs spécifiques des cellules dendritiques immatures

ou ne présentent pas une augmentation de l'expression des autres marqueurs membranaires témoins d'une maturation. En particulier les résultats sont négatifs en ce qui concerne la densité élevée des molécules CD86 caractéristiques des cellules dendritiques matures, les cellules dendritiques n'ont donc pas considéré les 5 oligorhamnosides testés comme des signaux d'activation capables d'accélérer ou de transformer un DC immature en DC activée voire mature.

- *Dosage de l'IL-8 libérée par les kératinocytes stimulées avec l'activateur IL-1 $\beta$*

Le dosage de l'IL-8 permet d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires des 10 oligorhamnosides lorsqu'ils sont ajoutés simultanément à l'activateur utilisé : l'IL-1 $\beta$ . Ce dosage est réalisé sur le surnageant récupéré après le traitement. En effet, les kératinocytes humains normaux (KHN) mis en contact avec l'activateur IL-1 $\beta$  sécrètent de l'IL-8 et sa concentration dans les surnageants cellulaires passe de 15 3,2 pg/mL/ $\mu$ g protéines pour des KHN non traités à environ 32 pg/mL/ $\mu$ g protéines pour ceux qui sont activés.

Pour affiner le dosage de la cytokine, un dosage supplémentaire est réalisé, celui des protéines cellulaires. Il permettra d'exprimer, pour chaque puits, la quantité d'IL-8 sécrétée par  $\mu$ g de protéines cellulaires (méthode BCA décrite en partie expérimentale).

20 Les kératinocytes sont traités 24 heures avec oligorhamnosides et avec l'agoniste IL-1 $\beta$ . Après 24 heures, la cytokine IL-8 libérée dans les surnageants cellulaires est quantifiée au moyen d'un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). La gamme standard du kit commercial permet de faire correspondre l'absorbance mesurée à 450nm et la concentration en IL-8 (pg/mL) présente dans chacun des 25 surnageants cellulaires.

Les différentes concentrations testées sont évaluées sur 4 puits cellulaires. On obtient ainsi 4 valeurs distinctes de concentration en IL-8 (pg/mL) pour chaque condition de traitement. Ces quantifications peuvent être rapportées à la quantité de protéines par puits.

30 Une première expérience consiste à incuber l'IL-1 $\beta$  et les oligorhamnosides en même temps pendant 24 heures. Les résultats ci-après (cf. tableau 4) représentent la moyenne de ces 4 valeurs et l'écart type.

Traitements	Moy. IL-8 (pg/mL/µg protéines)	% inhibition
Témoin négatif	3,6 ± 0,9	
Témoin positif (IL-1β)	32,3 ± 8,7	
Stimulation IL-1β, 1 ng/mL		
1 mg/mL	23,5 ± 6,6	27 %
0,1 mg/mL	31,7 ± 5,5	/
0,01 mg/mL	31 ± 9,3	/
0,001 mg/mL	30,1 ± 5,9	/

Tableau 4 : Résultats du traitement des KHN avec l'IL-1β et différentes concentrations en oligorhamnosides pendant 24 heures.

Les résultats montrent que la mise en contact directe des oligorhamnosides avec l'activateur contribue à son inhibition, (27 %, 1 mg/mL) (cf. tableau 5) et que cet effet 5 n'est plus remarqué quand la concentration en oligorhamnosides diminue.

Une seconde expérience est réalisée où les oligorhamnosides sont utilisés en prétraitement pendant 8 heures sur les KHN avant d'ajouter l'IL-1β et les oligorhamnosides en même temps pendant 24 heures.

Comme précédemment, les deux dosages sont réalisés (IL-8 et protéines). Les résultats 10 sont résumés dans le tableau précédent (cf. tableau 5).

Traitements	Moy. IL-8 (pg/mL/µg protéines)	% inhibition
Témoin négatif	5,5 ± 0,9	
Témoin positif (IL-1β)	141,0 ± 12,7	
Stimulation IL-1β, 1ng/mL		
1 mg/mL	101,3 ± 16	28 %
0,1 mg/mL	117,0 ± 19,8	17 %
0,001 mg/mL	116,9 ± 15	17 %

Tableau 5 : Résultats du traitement des KHN avec l'IL-1β et différentes concentrations en oligorhamnosides pendant 24 heures après 8 heures de prétraitement avec les oligorhamnosides.

Les résultats montrent que la mise en contact en condition de prétraitement des KHN 15 avec les oligorhamnosides ne contribue pas vraiment à une augmentation de l'inhibition, (28 %, 1 mg/mL). Cependant cette inhibition est maintenant observable à plus faible concentration. Ceci nous permet de conclure que le prétraitement avec les oligorhamnosides favorise l'inhibition de la libération d'IL-8 dans le surnageant.

Nous pouvons supposer que les oligorhamnosides occupent les sites réactionnels des kératinocytes conduisant à l'inhibition de la réaction secondaire (blocage des sites de l'IL-1 $\beta$ ), cependant nous ne pouvons pas conclure sur le mécanisme d'inhibition du processus inflammatoire.

5

- Dosage de la prostaglandine, 6ketoPGF $_{1\alpha}$ , après stimulation des kératinocytes par le PMA.

La prostaglandine I2 (PGI $_2$ ) est un métabolite instable de la voie de dégradation de l'acide arachidonique. Comme la prostaglandine E2, il s'agit d'un médiateur de l'inflammation aux propriétés vasodilatrices. L'instabilité de la PGI $_2$  réside dans sa conversion rapide (hydratation non enzymatique) en 6-keto prostaglandine F $_{1\alpha}$  (6-ketoPGF $_{1\alpha}$ ). C'est donc cette prostaglandine qui est mesurée en tant que marqueur de la synthèse de PGI $_2$ .

Traitement	Moy. 6-ketoPGF $_{1\alpha}$ (pg/mL/ $\mu$ g protéines)	% inhibition
Témoin négatif	24,4 $\pm$ 5,5	
Témoin positif (IL-1 $\beta$ 1 ng/mL)	27,3 $\pm$ 2,2	
Témoin positif (PMA 10 ng/mL)	33,5 $\pm$ 2,3	
Stimulation 2 heures IL-1 $\beta$ 1 ng/mL		
1 mg/mL	23,5 $\pm$ 1,2	14 %
0,1 mg/mL	21,8 $\pm$ 0,8	20 %
0,001 mg/mL	25,4 $\pm$ 3,6	/
Indométhacine 1 $\mu$ M	22,6 $\pm$ 3,4	17 %
Stimulation 2 heures PMA 10 ng/mL		
1 mg/mL	27,5 $\pm$ 4,9	18 %
0,1 mg/mL	27,4 $\pm$ 4,6	18 %
0,001 mg/mL	29,4 $\pm$ 4,4	12 %
Indométhacine 1 $\mu$ M	20,9 $\pm$ 4,9	37 %

Tableau 6 : Résultats du traitement des KHN avec l'IL-1 $\beta$ , le PMA et différentes concentrations en oligorhamnosides après 4 heures de prétraitement avec les oligorhamnosides

Le PMA ou phorbol-12-myristate-13-acetate, est un activateur de la protéine kinase C. C'est un activateur non physiologique qui mime l'effet des cytokines dont l'IL-1 $\beta$  sur les KHNs, et incite la cellule à libérer une molécule lipidique, la prostaglandine 6ketoPGF<sub>1 $\alpha$</sub> . Cette prostaglandine est dosée au moyen d'un test ELISA. Les deux 5 activateurs IL-1 $\beta$  et PMA sont utilisés. L'indométhacine, analgésique de type aspirine est un anti-inflammatoire (AINS) qui stimule la réincorporation de l'acide arachidonique libre dans les triglycérides pour diminuer la libération des éicosanoïdes. Il est utilisé comme inhibiteur de la libération de 6-ketoPGF<sub>1 $\alpha$</sub> .

Deux expériences ont été réalisées, la première consiste à prétraiter les KHN avec les 10 oligorhamnosides pendant 4 heures, suivi de la stimulation pendant 2 heures, toujours en présence des oligorhamnosides. Les résultats sont résumés dans le tableau 6 précédent.

Une seconde expérience a été réalisée où le prétraitement avec les oligorhamnosides a été prolongé à 12 heures. Les résultats sont résumés dans le tableau 7 suivant.

15

Traitemen	Moy. 6-ketoPGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> (pg/mL/ $\mu$ g protéines)	% inhibition
Témoin négatif	19,5 ± 4,5	
Témoin positif (IL-1 $\beta$ 1 ng/mL)	35,5 ± 5,3	
Stimulation 2 heures IL-1 $\beta$ 1 ng/mL		
2 mg/mL	28,2 ± 3,8	21 %
1 mg/mL	30,6 ± 3,1	14 %
0,5 mg/mL	35,2 ± 0,4	/
0,1 mg/mL	31 ± 5,1	/
Indométhacine	22,6 ± 3,4	36 %

Tableau 7 : Résultats du traitement des KHN avec l'IL-1 $\beta$  et différentes concentrations en oligorhamnosides après 12 heures de prétraitement avec les oligorhamnosides

Dans ces conditions expérimentales, la libération du médiateur 6-ketoPGF<sub>1 $\alpha$</sub>  par les 20 KHN stimulés est faible. Il apparaît toutefois une légère inhibition de celle-ci lorsque les cellules sont traitées par les oligorhamnosides à forte concentration, supérieure à 1 mg/mL.

- Dosage de la PGE<sub>2</sub> libérée par les KHN stimulées par le PMA.

Les oligorhamnosides ont pu être évalués en tant qu'inhibiteur de la libération de PGE<sub>2</sub> dans les surnageants cellulaires. Ces produits sont mis en présence des KHN en même temps que le PMA à 1 ng/mL. Chaque condition testée est évaluée sur 4 puits de KHN pour la stimulation.

Après 24 heures de traitement, les résultats résumés dans le tableau 8 suivant représentent les moyennes des valeurs des concentrations en PGE<sub>2</sub> (pg/mL) données dans chacun des surnageants cellulaires stimulés ou non et rapportées à une quantité de cellules exprimées en µg.

10

	2 mg/mL	1,5 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
Oligorhamnosides	58 % 72 %	60 %	25 % 53 % 49 %	27 %	/

Tableau 8 : Pourcentage d'inhibition de la libération de PGE<sub>2</sub> en fonction de la concentration des dérivés rhamnosylés.

Les oligorhamnosides inhibent la libération de PGE<sub>2</sub> à des concentrations assez élevées : 2 mg/mL à 1 mg/mL avec une inhibition moyenne de 50 à 60 %. Pour des concentrations inférieures, son pouvoir inhibiteur diminue et devient nul à 0,1 mg/mL.

- Dosage des molécules LTB<sub>4</sub> et PGE<sub>2</sub> libérées par les polynucléaires neutrophiles humains

Les neutrophiles sont isolés de sang courant humain et purifiés par un procédé original. Ils sont ensuite activés par un tampon de stimulation qui provoquera la libération des deux types de molécules lipidiques issues des voies cyclo-oxygénase et lipo-oxygénase, dérivées de l'acide arachidonique, à savoir le leucotriène LTB<sub>4</sub> et la prostaglandine PGE<sub>2</sub>. Ce tampon de stimulation contient en particulier des ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>. Ces dosages sont effectués au moyen d'un kit commercial qui répond à une méthode de dosage de type ELISA.

La viabilité cellulaire des neutrophiles traités avec les oligorhamnosides est évaluée au bleu trypan. Les viabilités sont bonnes même aux concentrations les plus élevées en oligorhamnosides.

Les résultats représentent les moyennes des valeurs dosées dans deux surnageants de cellules stimulées au cours d'une même expérience.

Les résultats obtenus sur l'inhibition de la libération des molécules lipidiques sont résumés dans le tableau 9 suivant.

5

PGE <sub>2</sub> libérée (pg/mL)			
Traitement	Sans stimulation	Stimulation	% inhibition
Témoin négatif	3,2 ± 0,3	22,1 ± 2,8	
1 mg/mL	4 ± 0,7	19,6 ± 2,3	11 %
0,5 mg/mL	4,3 ± 0,6	22,8 ± 0,9	/
0,1 mg/mL	4,6 ± 0,6	20 ± 2,6	/
Indométhacine 1 µM	4,5 ± 0	6,8 ± 1	69 %
LTB <sub>4</sub> libérée (pg/mL)			
Traitement	Sans stimulation	Stimulation	% inhibition
Témoin négatif	24,3	2494 ± 105	
1 mg/mL	19,8	1857 ± 97	26 %
0,5 mg/mL	33,3	2199 ± 122	12 %
0,1 mg/mL	34,1	2073 ± 169	17 %
NDGA 0,1 µM	/	684 ± 185	73 %

Tableau 9 : Résultats du traitement des polynucléaires neutrophiles avec un tampon de stimulation et différentes concentrations en oligorhamnosides.

L'indométhacine est utilisé comme inhibiteur spécifique de la libération de PGE<sub>2</sub> et l'acide Nordihydroguaiarétique comme inhibiteur spécifique de la libération de LTB<sub>4</sub>.  
10 Ce tableau permet de conclure qu'il y a une très faible inhibition de la libération de PGE<sub>2</sub> (11 %) observée après le traitement des neutrophiles avec les oligorhamnosides. Cependant, en présence d'une concentration de 1 mg/mL d'oligorhamnosides, une inhibition de la libération de LTB<sub>4</sub> de 26 % est obtenue et confirmée.

15

En conclusion, les oligorhamnosides à une concentration de 1 mg/mL assurent une inhibition de la libération de l'IL-8 de 27 à 28 % par des KHN dans deux expériences indépendantes cependant la libération de 6-ketoPGF<sub>1α</sub> par les KHN est très

légèrement diminuée. A plus fortes concentrations, de 1 à 2 mg/mL les oligorhamnosides inhibe en moyenne de 50 à 60 % la libération de PGE<sub>2</sub> par des KHN. Ces mêmes molécules à une concentration de 1 mg/mL contribuent à une inhibition de 21 et 26 % de la libération de LTB<sub>4</sub> par des neutrophiles dans deux expériences indépendantes. Ces molécules n'ont aucun effet sur la libération de PGE<sub>2</sub> par des neutrophiles humains.

## REVENDICATIONS

1- Procédé de préparation d'oligorhamnosides, caractérisé en ce qu'il comprend les  
5 étapes successives suivantes :

- a) autocondensation du rhamnose en une seule étape réactionnelle dans l'acétonitrile en présence d'un catalyseur acide et précipitation des oligorhamnosides ainsi formés ; puis
- b) récupération du précipité obtenu suite à l'étape a), comprenant les  
10 oligorhamnosides, par filtration.

2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la température du mélange réactionnel, lors de l'étape a), est comprise entre 20 et 120°C, avantageusement entre 35 et 75°C.

15 3- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le catalyseur acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide ortho-, méta-, et para-toluène sulfonique, l'acide benzène-sulfonique, les acides benzène-sulfoniques substitués,  
20 l'acide méthane-sulfonique, les acides de Lewis, notamment le chlorure de zinc ou le chlorure ferrique, des argiles acides, notamment la montmorillonite K-10, des résines acides synthétiques, les zéolithes ou leurs combinaisons.

25 4- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'eau formée pendant la réaction d'autocondensation de l'étape a) est éliminée physiquement ou chimiquement.

30 5- Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la technique d'élimination de l'eau comprend l'utilisation d'un agent de dessiccation choisi dans le groupe constitué par les carbonates, les sulfates, le chlorure de calcium, le pentaoxyde de phosphore, des tamis moléculaires ou des combinaisons de ces divers agents de dessiccation.

- 6- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape a) est réalisée à pression atmosphérique et sous atmosphère d'un gaz inerte, tel que l'argon ou l'azote.
- 5    7- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape a) est réalisée à pression réduite, en autoclave.
- 8- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que préalablement à l'étape b), le mélange réactionnel est refroidi jusqu'à une 10 température comprise entre la température de réaction de condensation et 0°C.
- 9- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le mélange réactionnel est refroidi jusqu'à la température ambiante, avantageusement jusqu'à 20°C.
- 15    10- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le précipité récupéré suite à l'étape b) est lavé à l'acétonitrile.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'acétonitrile compris dans le filtrat obtenu suite à l'étape b) est évaporé afin de 20 récupérer un second précipité comprenant des oligorhamnosides.
- 12- Composition comprenant un mélange d'oligorhamnosides susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que lesdits oligorhamnosides contiennent de 2 à 12 motifs rhamnoses, 25 avantageusement de 2 à 9 motifs rhamnoses.
- 13- Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce que la distribution des oligorhamnosides en fonction de leur degré de polymérisation suit approximativement une loi de distribution type loi de Poisson.

- 14- Composition selon les revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que les motifs rhamnoses ont jusqu'à trois de leurs fonctions hydroxyles qui sont impliquées dans la formation de liaisons glycosidiques.
- 5     15- Médicament comprenant une composition telle que définie à l'une quelconque des revendications 12 à 14.
- 16- Médicament selon la revendication 15, destiné à réguler les mécanismes inflammatoires.
- 10    17- Médicament selon la revendication 15 ou 16, destiné à la prévention ou au traitement des réactions ou pathologies allergiques, inflammatoires, immunitaires de la peau et/ou des muqueuses.
- 15    18- Médicament selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, destiné à inhiber la réponse immune liée au stress inflammatoire.
- 19- Médicament selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, destiné à inhiber l'activation des leucocytes, la sécrétion des cytokines kératinocytaires, le phénomène d'hyperplasie kératinocytaire, le processus d'apprêttement de l'antigène par les cellules dendritiques de la peau, la maturation des cellules présentatrices d'antigène, le phénomène de reconnaissance entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène.
- 20    20- Médicament selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, destiné à la prévention ou au traitement des maladies choisies dans le groupe constitué de l'eczéma atopique et/ou de contact, des dermatoses inflammatoires, des dermatites irritatives, de l'acné, des maladies auto-immunes telles que le psoriasis, de la photo-immuno-suppression, du vitiligo, du pityriasis, des sclérodermies, de l'arthrite rhumatoïde, de la maladie de Crohn ou du rejet de greffe.

- 21- Médicament selon l'une quelconque des revendications 15 à 20, destiné à la prévention et au traitement des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences.
- 5     22- Médicament selon la revendication 21, destiné à la prévention ou au traitement des maladies choisies dans le groupe constitué par les sensibilisations anaphylactiques, les anomalies pigmentaires de la peau, l'hypervascularisation dermique, les fissurations inflammatoires.
- 10    23- Médicament selon l'une quelconque des revendications 15 à 22, destiné à diminuer le caractère allergisant et/ou irritant d'une composition ou d'un parfum.
- 15    24- Médicament selon l'une quelconque des revendications 15 à 23, caractérisé en ce qu'il comprend 0,001 à 50 % en poids d'oligorhamnosides.
- 20    25- Méthode de traitement cosmétique des peaux et/ou des muqueuses sensibles, irritées, intolérantes, à tendance allergique, âgées, soumises à un signal danger, présentant un trouble de la barrière cutanée, présentant des rougeurs cutanées ou présentant un déséquilibre immunologique non pathologique lié au vieillissement intrinsèque, extrinsèque ou hormonal, caractérisée en ce qu'elle consiste à appliquer sur la peau et/ou les muqueuses une composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 14.
- 25    26- Méthode de traitement cosmétique pour retarder le vieillissement naturel de la peau et/ou pour prévenir le vieillissement accéléré de la peau soumise aux agressions extérieures, notamment pour prévenir le vieillissement photo-induit de la peau, caractérisée en ce qu'elle consiste à appliquer sur la peau une composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 14.

1/2

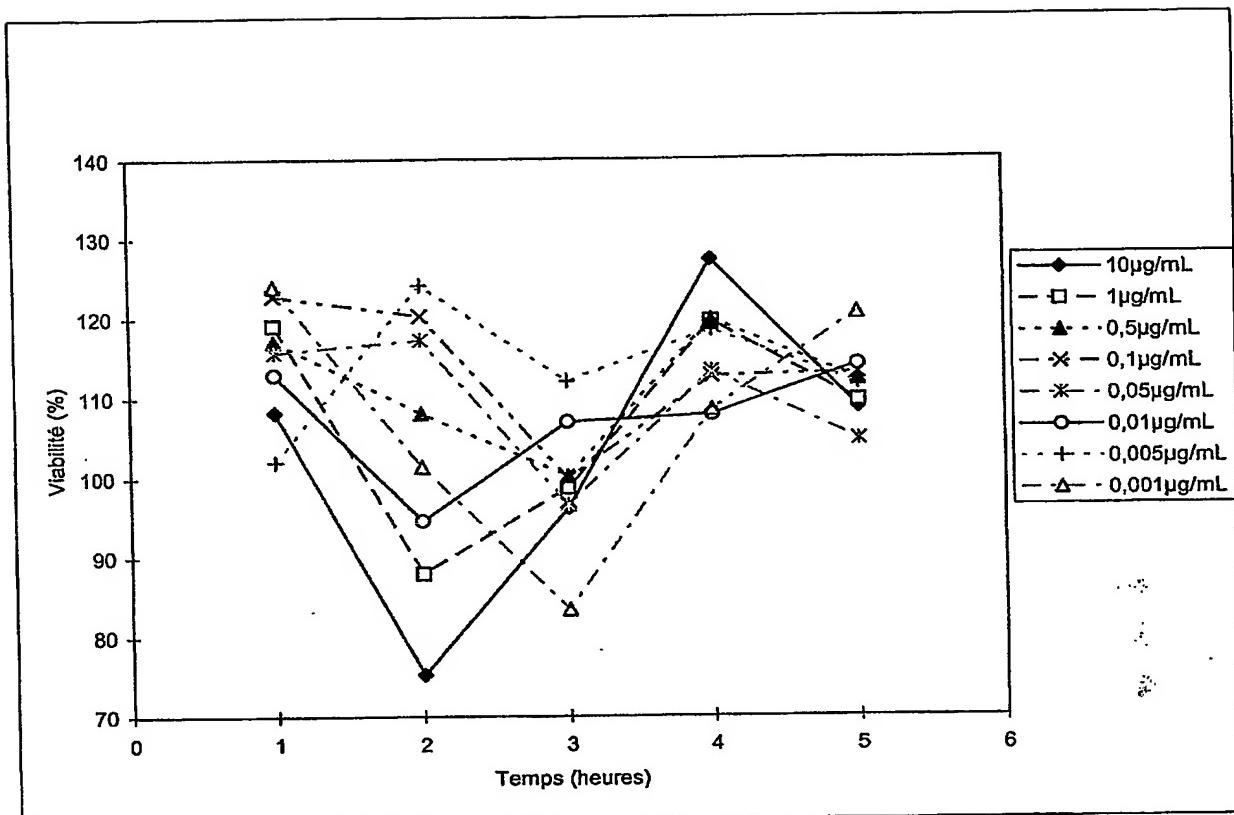


Figure 1

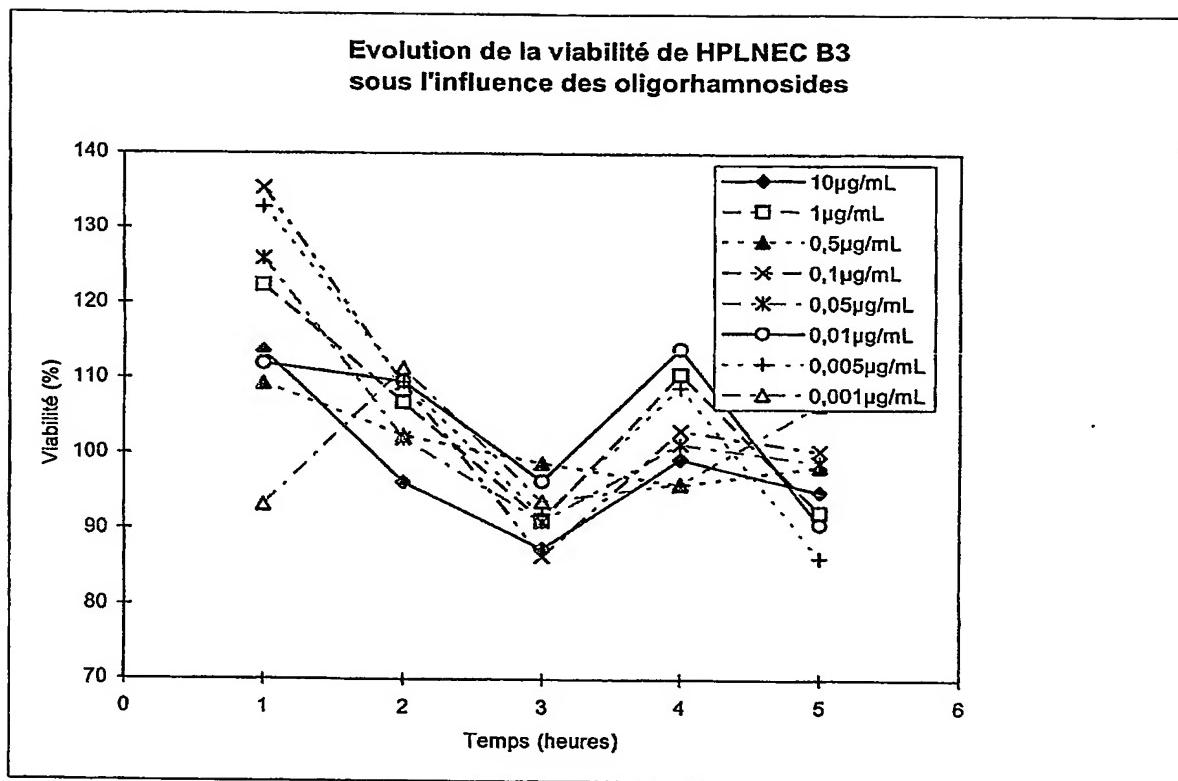


Figure 2

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**cerfa**  
N° 11235\*03

### PARTEMENT DES BREVETS

bis, rue de Saint Pétersbourg  
300 Paris Cedex 08  
éphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

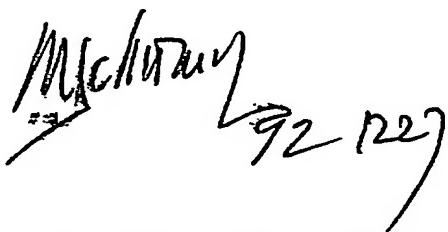
DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .1. / 2..

**INV**

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Les références pour ce dossier (facultatif)			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		240237 D20831 ANB 0312796	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
<p>Procédé de synthèse directe d'oligorhamnosides, composition comprenant des oligorhamnosides et utilisation en tant que médicament.</p>			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
<p>1) PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE : 45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT FRANCE - FRANCE</p>			
<p>2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) : 3, rue Michel Ange 75016 PARIS - FRANCE</p>			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :			
1 Nom			
Prénoms		HOULMONT Jean-Philippe	
Adresse	Rue	87, Chemin de la salade pensan Bât B, Apt 66	
	Code postal et ville	31400 TOULOUSE FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
2 Nom			
Prénoms		RICO-LATTES Isabelle	
Adresse	Rue	118, Allée de Pierras	
	Code postal et ville	31650 AUZIELLE FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
3 Nom			
Prénoms		PEREZ Emile	
Adresse	Rue		
	Code postal et ville	17, Allée d'Aspin	
Société d'appartenance (facultatif)		31770 COLOMIERS FRANCE	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> <b>(Nom et qualité du signataire)</b>			
SCHRIMPF			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

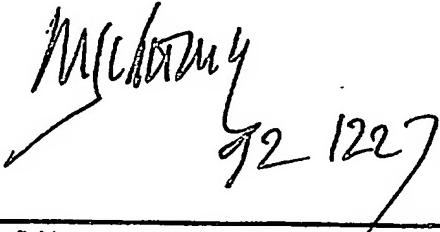
**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° .2. / 2.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

**INV**

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>																																												
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		240237 D20831 ANB 0312796																																										
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)																																												
Procédé de synthèse directe d'oligorhamnosides, composition comprenant des oligorhamnosides et utilisation en tant que médicament.																																												
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>																																												
1) PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE : 45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT FRANCE - FRANCE																																												
2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) : 3, rue Michel Ange 75016 PARIS FRANCE																																												
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>																																												
<table border="1"> <tr> <td><b>1</b></td> <td><b>Nom</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>BORDAT Pascal</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>2, Chemin de l'Eglise</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>921320 MERVILLA FRANCE</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td><b>2</b></td> <td><b>Nom</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td><b>3</b></td> <td><b>Nom</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>			<b>1</b>	<b>Nom</b>		Prénoms		BORDAT Pascal	Adresse	Rue	2, Chemin de l'Eglise	Code postal et ville	921320 MERVILLA FRANCE	Société d'appartenance (facultatif)			<b>2</b>	<b>Nom</b>		Prénoms			Adresse	Rue		Code postal et ville	_____	Société d'appartenance (facultatif)			<b>3</b>	<b>Nom</b>		Prénoms			Adresse	Rue		Code postal et ville	_____	Société d'appartenance (facultatif)		
<b>1</b>	<b>Nom</b>																																											
Prénoms		BORDAT Pascal																																										
Adresse	Rue	2, Chemin de l'Eglise																																										
	Code postal et ville	921320 MERVILLA FRANCE																																										
Société d'appartenance (facultatif)																																												
<b>2</b>	<b>Nom</b>																																											
Prénoms																																												
Adresse	Rue																																											
	Code postal et ville	_____																																										
Société d'appartenance (facultatif)																																												
<b>3</b>	<b>Nom</b>																																											
Prénoms																																												
Adresse	Rue																																											
	Code postal et ville	_____																																										
Société d'appartenance (facultatif)																																												
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.																																												
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> <b>(Nom et qualité du signataire)</b>																																												
 SCHRIMPF																																												

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**